



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b> <b>A01N 65/00, 25/02, 25/30</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 92/16109</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 1. Oktober 1992 (01.10.92)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE92/00220 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 14. März 1992 (14.03.92) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 41 09 473.5 22. März 1991 (22.03.91) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> TRIFOLIO-M GMBH, HERSTELLUNG UND VERTRIEB HOCHREINER BIOSUBSTANZEN [DE/DE]; Sonnenstraße 22, D-6335 Lahnau 2 (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> KLEEBERG, Hubertus [DE/DE]; Sonnenstraße 22, D-6335 Lahnau 2 (DE).		<b>(74) Anwalt:</b> MISSLING, A.; Bismarckstraße 43, D-6300 Gießen (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CI (OAPI Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GN (OAPI Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LK, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), RU, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(54) Title:</b> PROCESS FOR PRODUCING A STORABLE AZADIRACHTIN-RICH INSECTICIDE FROM SPERM NUCLEI OF THE NEEM TREE <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES LAGERFÄHIGEN AZADIRACHTINREICHEN INSEKTIZIDS AUS SAMENKERNEN DES NEEM-BAUMES <b>(57) Abstract</b> <p>The invention discloses a process for producing a storable azadirachtin-rich insecticide from sperm nuclei of the neem tree. The insecticide consists of sperm nuclei of the neem tree which are crushed, dissolved and extracted. The solvent used is water, and the aqueous extract is mixed with an organic solvent which is incompletely miscible with water and in which the azadirachtin has a higher solubility than in water. Following phase separation, the solvent containing the azadirachtin is concentrated and finally removed. The elimination can also be carried out by adding a tenside to the aqueous extract containing the azadirachtin, mixing, heating to a temperature above the cloud point, separating the phases and then isolating the azadirachtin-rich tenside phase.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines lagerfähigen azadirachtinreichen Insektizids. Das Insektizid besteht aus den Samenkernen des Neem-Baumes, welche zerkleinert, gelöst und extrahiert werden. Als Lösungsmittel dient Wasser, wobei dem Wasserextrakt ein mit Wasser nicht vollständig mischbares organisches Lösungsmittel zugesetzt wird, das eine größere Löslichkeit für das Azadirachtin als das Wasser hat. Nach erfolgter Phasentrennung wird das Azadirachtin enthaltene Lösungsmittel konzentriert und schließlich abgetrennt. Zur Ausscheidung kann auch dem Azadirachtin enthaltenen Wasserextrakt ein Tensid zugesetzt werden, worauf nach Mischung eine Erwärmung auf eine Temperatur erfolgt, die oberhalb der Trübungstemperatur liegt, wobei nach erfolgter Phasentrennung die azadirachtinreiche Tensidphase abgetrennt wird.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

- 1 -

5

10

**Verfahren zur Herstellung eines lagerfähigen azadirachtinreichen Insektizids aus Samenkernen des Neem-Baumes**

**Beschreibung:**

15

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines lagerfähigen azadirachtinreichen Insektizids aus Bestandteilen insbesondere aus den Samenkernen des Neem-Baumes, bei dem zunächst die Bestandteile zerkleinert werden und den zerkleinerten Bestandteilen ein Lösungsmittel zugesetzt ist, das das Azadirachtin aus den Bestandteilen extrahiert, wobei im Anschluß hieran das Azadirachtin im Lösungsmittels angereichert wird.

20

25

Zahlreiche Untersuchungen haben zur Erkenntnis geführt, daß davon ausgegangen werden kann, daß unter den Inhaltstoffen der verschiedenen Teile - insbesondere der Früchte - des Neem-Baumes (*Azadirachta indica* A. Juss) solche mit optimalen Eigenschaften für einen umweltfreundlichen Pflanzenschutz enthalten sind. Azadirachtin gehört in diesem Zusammenhang zu den potentesten und in größeren Mengen (ca. 1 bis 20 g pro kg) in den Früchten des Neem-Baumes vorkommenden Substanzen.

30

35

Die Früchte des Neem-Baumes wurden bereits zur Herstellung eines Insektizids verwandt, z.B. mit einem Verfahren gemäß US-PS 4,556,562. Nach diesem Verfahren werden ethanollösliche Inhaltsstoffe mit diesem Alkohol bei 80 °C extrahiert.

- 2 -

Im Anschluß hieran wird der Alkohol abgedampft und der Rückstand mit einer Detergentien-Wassermischung formuliert. Bei diesem bekannten Extraktionsverfahren wie auch bei anderen bekannten Extraktionsverfahren, bei denen organische Lösungsmittel verwendet werden, muß zur Gewinnung eines festen Wirkstoffkonzentrates das Lösungsmittel abgedampft werden. Alle bekannten Verfahren, die ein ölarmses Produkt ergeben, erfordern zahlreiche arbeitsintensive Reinigungsschritte (Ausschütteln, Einengen) wobei ohne Anwendung noch aufwendigerer Trennverfahren wie beispielsweise chromatographischer Methoden, die Azadirachtinhalte des Produktes nur zwischen wenigen bis zu etwa 35 % liegen.

Schwierigkeiten bereitet insbesondere die wirtschaftliche Abtrennung des störenden Öls. Dieses Öl wird gemäß den derzeit bekannten Extraktionsmethoden entweder vor oder nach der Isolierung der azadirachtinreichen Inhaltsstoffe abgetrennt.

Das Öl kann z.B. durch Extraktion mit Kohlenwasserstoffen (z.B. Petroläther, Hexan) oder durch Pressen aus den gemahlenden Neem-Kernen entfernt werden. Insbesondere beim Pressen tritt eine Temperaturerhöhung des Neem-Materials ein, welche zu einer mehr oder weniger starken Zersetzung des Azadirachtins führt und damit die spätere Ausbeute an Wirkstoff erheblich verringert.

Der durch die Extraktion der gemahlenden Neem-Kerne mit organischen Lösungsmitteln wie Alkoholen, Ketonen oder halogenierten Kohlenwasserstoffen erhaltene Rohextrakt wird häufig nach der Überführung in ein mit Wasser mischbares Lösungsmittel durch Ausschütteln mit Kohlenwasserstoffen (z.B. Petroläther, Hexan) von Öl befreit. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß ein Teil des Wirkstoffes in die Ölphase gelangt und somit den Ertrag mindert.

- 3 -

Zur Isolierung des azadirachtinhaltigen Wirkstoffes ist es des weiteren bekannt einen wäßrigen Extrakt der Neem-Kerne zu verwenden, dem der Wirkstoff mit Methyl-t-Butylether entzogen wird. Im Anschluß hieran wird der Methyl-t-Butylether abgedampft und der Rückstand wird in Methanol aufgenommen. Im Anschluß wird dieser mit Petrolether ausgeschüttelt und eingeengt. Durch diese Maßnahme erhält man eine Ausbringung von 0,8 % bezogen auf die Neem-Kerne eines biologisch aktiven Produktes. Ein derartiges Verfahren ist wirtschaftlich nicht einsetzbar.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde ein wirtschaftliches und damit preiswertes Verfahren vorzuschlagen, das technisch einfach ist und eine hohe Ausbringung von azadirachtinhaltigem Insektizid ermöglicht, wobei das erhaltene Insektizid weitgehend frei von Öl ist.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen des Anspruches 1 gelöst.

Gemäß der Erfindung werden die Neem-Kerne vorteilhaft zunächst zerkleinert, wobei als Lösungsmittel Wasser zugesetzt wird. Diese Extraktion des Azadirachtins aus den Kernen kann mehrfach mit frischem Wasser wiederholt werden, bis der Wirkstoff bis zu 90 % aus dem Mahlgut entfernt ist. Im Anschluß hieran muß der Wirkstoff aus dem Wasser extrahiert werden, was auf zwei Arten geschehen kann.

Zum einen wird dem Wasser, welches den Wirkstoff enthält, ein nicht vollständig mit Wasser mischbares organisches Lösungsmittel zugesetzt, welches eine größere Löslichkeit für das Azadirachtin hat als das Wasser selbst. Nach erfolgter Durchmischung und Aufnahme des Azadirachtins durch das organische Lösungsmittel erfolgt eine Ruhephase, in der eine Phasentrennung eintritt. Diese Art der Gewinnung des Azadi-

- 4 -

rachtins in zunächst wäßriger Lösung hat den Vorteil, daß störendes Öl nicht in der azadirachtin reichen Phase anfällt und somit nicht mehr mühselig aus dieser entfernt werden muß. Im Anschluß daran wird die das Azadirachtin enthaltende Lösung eingeengt, worauf dann das Konzentrat in die 1 bis 20-fachen Volumenmenge eines flüssigen Kohlenwasserstoffes eingegeben und mit diesem verrührt wird. Als Produkt erhält man einen sich am Boden abscheidenden azadirachtinreichen Niederschlag, der entnommen und getrocknet werden kann. Mit diesem Verfahren wird ein fester Wirkstoff mit großer Lagerfähigkeit erhalten.

Gemäß dem zweiten Weg des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem das Azadirachtin enthaltene Wasser ein Tensid mit einer Trübungstemperatur zugegeben, die vorteilhaft zwischen 20 und 80 °C liegt. Dieses Tensid hat wiederum eine höhere Löslichkeit für das Azadirachtin als das Wasser, so daß nach Temperaturerhöhung über die Trübungstemperatur und der dadurch bedingten Phasentrennung die azadirachtinreiche Phase abgetrennt werden kann. Der so erhaltene Wirkstoff kann entweder unmittelbar eingesetzt werden oder aber auch für eine weitere Lagerung eingeengt werden.

Die auf dem ersten oder zweiten Weg gewonnen Wirkstoffkonzentrate können vorteilhaft mit Tensiden formuliert werden, wobei vorteilhaft Polyäthylenoxidderivate, wie sie auch zur Extraktion eingesetzt werden, verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachstehend anhand mehrerer Beispiele näher erläutert.

Beide im folgenden beschriebene Verfahren basieren auf der Anwendung von Wasser als primärem Extraktionsmittel. Hierzu werden die Samenkerne der getrockneten Neem-Früchte (beispielsweise unter Verwendung eines Fleischwolfes mit einer

Scheibe deren Löcher Durchmesser von etwa 3 bis 8 mm besitzen) gemahlen. Das erhaltene Mahlgut wird sodann in die etwa 5 bis 20-fache Menge (optimal so, daß die Mahlgutphase ca. 30 bis 50 % des Gesamtansatzes beträgt; bei Sedimentation entspricht das ca. der 6 bis 10-fachen Menge Wasser, beispielsweise bei Zentrifugation nur etwa einem Wasserzusatz der 2 bis 5-fachen Mahlgutmenge) Wasser bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) eingerührt, während 3 bis etwa 12 Stunden (oder mehr - das Gleichgewicht der Verteilung von Azadirachtin zwischen Mahlgut und Wasser ist nach etwa 5 Stunden weitgehend erreicht - Temperaturerhöhung bis 70 °C beschleunigt die Gleichgewichtseinstellung etwas) mehrfach gerührt (ca. alle 30 Minuten) und dann zur Sedimentation für 1 bis 3 Stunden stehen gelassen. Die Trennung der wäßrigen Phase vom Bodensatz kann durch verschiedene physikalische Maßnahmen wie Filtration, Sedimentation, Zentrifugation erfolgen. Nach dieser Zeit bildet sich ein aus den nicht gelösten Resten der Neem-Kerne bestehender Bodensatz, von dem die leicht trübe wässrige Lösung abgetrennt wird.

Zur Erhöhung der Ausbeute kann die Extraktion mit frischem Wasser und dem Bodensatz wiederholt werden. Im allgemeinen befinden sich nach 2 bis 3 Extraktionen etwa 90 % des vorhandenen Azadirachtin in der wäßrigen Phase. Die wäßrige Phasen (Wasserextrakt) können zur weiteren Verarbeitung vereinigt werden.

#### Lösungsmittlextraktion

Dem Wasserextrakt wird ein mit Wasser nicht vollständig mischbares organisches Lösungsmittel z.B. Ketone (wie Butanon, Pentanon, Hexanon), Alkohole (wie 1-Butanol, Pentanol), Ester (wie Essigsäureethylester, Essigsäure-n-butylester) oder halogenierte Kohlenwasserstoffe (wie Dichlormethan, Trichlormethan) etwa im Verhältnis Lösungsmit-

- 6 -

tel : Wasser  $\approx$  1 : 10 unter Durchmischung zugesetzt und dann mehrere Stunden stehen gelassen, bis sich die nicht mischbaren Phasen getrennt haben (ca. 5 bis 24 Stunden). Die organische Phase wird abgetrennt und auf ca. 1/5 bis 1/10 des Volumens eingeengt. Das erhaltene Konzentrat wird langsam in das 5 bis 20-fache Volumen an flüssigen Kohlenwasserstoffen wie Hexan, Petrolether eingebracht, worauf sich ein weißer bis gelblicher Niederschlag bildet. Nach einigen Minuten hat sich der Niederschlag am Gefäßboden gesammelt, so daß die unpolare organische Lösung leicht abgegossen werden kann. Nach Trocknen des Niederschlages beträgt der Azadirachtin Gehalt etwa 30 bis 60 % mit einer Ausbeute von 80 bis 95 % in Bezug auf den Azadirachtin Gehalt der verwendeten Neem-Kerne. Die insektizide Aktivität des Produktes kommt derjenigen des reinen Azadirachtins praktisch gleich, da auch die anderen vorhandenen Inhaltsstoffe - vermutlich - insektizid wirken.

#### Extraktion mittels Tensiden

Der Wasserextrakt wird bei Raumtemperatur mit etwa 1 bis 10% (optimal sind ca. 4 %) eines Tensids mit Trübungstemperatur zwischen etwa 20 und 80 °C (wie p-tertiär-Octylphenol-7,5-glykolether, p-tertiär-Octylphenol-8-10-glykolether, Ölsäure-amidheptaglykolether, Dodecylalkoholheptaglykolether, p-Iso-nonylphenoldekaglykolether) gemischt und auf eine Temperatur, die um einige Grade - etwa 5° - oberhalb der Trübungstemperatur liegt, erwärmt. Die nach kurzem Stehen gebildete tensid- und azadirachtinreiche (untere) Phase wird abgetrennt und kann direkt als Pflanzenschutzmittelkonzentrat verwendet werden.



- 7 -

Beispiel 1:Extraktion mittels Essigsäureethylester

1 kg Neem-Kerne werden unter Verwendung eines Fleischwolfes, mit einer Vorsatzscheibe deren Löcher einen Durchmesser von etwa 4 mm besitzen, gemahlen und in 2,5 l Wasser mit einer Temperatur von 30 °C eingerührt. Nach 10 stündigem Stehen wird die wäßrige Phase vom Mahlgutrückstand abgegossen. Der Mahlgutrückstand wird zur weiteren Entfernung der wäßrigen Phase durch ein Leinentuch gepreßt. Die gesamte erhaltene wäßrige Phase (1,9 l) wird mit 250 ml Essigsäureethylester gemischt und im Schütteltrichter bei Raumtemperatur 6 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird die obere, esterreiche Phase (ca. 150 ml) abgetrennt, zur wäßrigen Phase 200 ml Essigsäureethylester zugegeben und wieder gemischt. Nach Abnahme der Esterphase nach ca. 4 Stunden wird die Extraktion mit 200 ml Ester wiederholt. Die drei Esterphasen (insgesamt ca. 500 ml) werden vereinigt und im Vakuum bei ca. 45 °C auf 1/10 ihres Volumens eingeeengt. Der Destillationsrückstand wird noch warm langsam in 400 ml Petrolether eingerührt, wobei der azadirachtinhaltige Wirkstoff ausfällt und sich nach ca. 30 Minuten vollständig am Boden abgesetzt hat. Die flüssige Phase wird abgeschüttet, der Niederschlag in ca. 20 ml frischen Petrolether aufgenommen, zentrifugiert und der Petrolether vom Niederschlag abgeschüttet. Nach Trocknung des Niederschlages für 12 Stunden bei 30 °C werden 4,61 g eines leicht gelblichen Pulvers erhalten, dessen Azadirachtiningehalt nach HPLC-Analyse 44 % beträgt.

Bei zweimaliger Wiederholung der Wasserextraktion des Mahlgutrückstandes mit Essigsäureethylester werden noch 0,87 g und 0,58 g pulverförmiges Rohazadirachtin mit Azadirachtiningehalten von 35 und 41 % erhalten. Insgesamt ergab diese

- 8 -

Extraktion also 6,06 g gelbliches Pulver bei einer Azadirachtinmenge von 2,6 g. Die Analyse des Azadirachtin-  
gehaltes der Neem-Kerne von denen ausgegangen wurde ergibt 2,9 g  
Azadirachtin/kg Kerne. Die Gesamtausbeute an Azadirachtin  
5 beträgt also 90 %.

### Beispiel 2:

#### Extraktion mit Tensiden

5 kg Neem-Kerne werden unter Verwendung eines Fleischwol-  
fes, mit einer Vorsatzscheibe deren Löcher einen Durchmes-  
10 ser von etwa 6 mm besitzen, gemahlen und in 70 l Wasser mit  
einer Temperatur von 20 °C eingerührt. Nach 10 stündigem  
Stehen wird die obere, wäßrige Phase (45 l) vom Mahlgut-  
rückstand (35 l) abgetrennt und in einem 60 l Faß mit Aus-  
lauf unten mit 1,45 l p-tertiär-Octylphenol-7,5-glykolether  
15 bei 18 °C gut durchmischt.

Mittels eines an einem auf 75 °C eingestellten Umwälzther-  
mostaten angeschlossenen PVC-Schlauches (15 m Länge, 2 cm  
äußerer Durchmesser), der in das 60 l Faß gewickelt ist,  
wird der tensidhaltige Wasserextrakt innerhalb von 3 Stun-  
20 den auf 63 °C erwärmt, wobei sich schon bald eine tensid-  
reiche Phase am Faßboden abscheidet, die ca. alle 30 Minu-  
ten durchgerührt wird. Bei Erreichen einer Temperatur von  
63 °C wird die Lösung noch ca. 30 Minuten stehen gelassen  
und sodann die untere Phase (5,5 l) abgelassen. Der Azadi-  
25 rachtin-gehalt der oberen und unteren Phase beträgt 2,7 bzw.  
5,4 g. Für die tensidreiche Phase entspricht dies einer  
Azadirachtinkonzentration von 1 g Azadirachtin/l. Diese Lö-  
sung kann beispielsweise nach Verdünnung mit Wasser im Ver-  
hältnis 1 : 50 direkt als Pflanzenschutzmittel eingesetzt  
30 werden. Durch Wiederholung der Phasentrennung mit frischem  
Tensid oder Erhöhung der anfänglichen Tensidkonzentration

- 9 -

kann die Ausbeute gesteigert werden.

Für dieses Verfahren ist es sinnvoll die Trübungstemperatur in einem möglichst weiten Temperaturbereich einstellen zu können. Dies ist beispielsweise möglich bei Verwendung von  
5 Mischungen verschiedener Tenside (wie p-tertiär-Octylphenol-7,5-glykolether und p-tertiär-Octylphenol-8-10-glykolether; für diese beiden Substanzen wird ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Trübungstemperatur und der Massenzusammensetzung der beiden Tenside gefunden).

10 Zusammenfassend ist festzuhalten:

Ausführliche Wirksamkeitsuntersuchungen (bezogen auf den Azadirachtin Gehalt) zeigen, daß die biologische Aktivität der gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Wirkstoffe, derjenigen des reinen Azadirachtin etwa gleich  
15 kommt.

Die beschriebenen Verfahren haben den Vorteil, daß sie mit einem Minimum an Extraktionsschritten und wenigen organischen Lösungsmitteln auskommen und dabei der Ölgehalt der Produkte trotzdem vernachlässigbar ist. Aus den bei diesen  
20 Verfahren anfallenden Rückständen kann nach Wunsch das Neem-Öl leicht nach bekannten Verfahren extrahiert werden.

Die beschriebenen Verfahren stellen eine sehr einfache und wirtschaftliche Möglichkeit da, ein botanisches, umweltfreundliches Insektizid herzustellen.

- 10 -

5

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines lagerfähigen azadirachtinreichen Insektizids aus Bestandteilen insbesondere aus  
10 den Samenkernen des Neem-Baumes, bei dem gegebenenfalls  
zunächst die Bestandteile zerkleinert werden und den  
Bestandteilen ein Lösungsmittel zugesetzt wird, das das  
Azadirachtin aus den Bestandteilen extrahiert, wobei im An-  
15 schluß hieran das Azadirachtin im Lösungsmittel ange-  
reichert ist, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel  
Wasser verwendet wird, daß die Trennung der festen weitge-  
hend vom Azadirachtin befreiten Bestandteile durch Filtra-  
tion, Sedimentation, Zentrifugation etc. erfolgt und daß  
dann entweder
- 20 a) dem das Azadirachtin enthaltende Wasserextrakt ein  
mit Wasser nicht vollständig mischbares organisches Lö-  
sungsmittel zugesetzt wird, das eine größere Löslich-  
keit für das Azadirachtin als das Wasser hat, daß im  
Anschluß hieran nach erfolgter Phasentrennung das orga-  
25 nische, das Azadirachtin enthaltende Lösungsmittel vom  
Wasser getrennt wird und daß anschließend die azadi-  
rachtrinhaltige Lösung konzentriert wird und daß das  
gewonnene Konzentrat in flüssigen Kohlenwasserstoff von  
1 bis 20-fachem Volumen eingegeben und mit diesen ver-  
30 mischt wird, wobei sich dann der sich bildende Azadi-  
rachtin enthaltende Niederschlag absetzt und abgetrennt  
wird, oder

- 11 -

b) daß dem das Azadirachtin enthaltende Wasserextrakt ein Tensid mit einer Trübungstemperatur, vorteilhaft zwischen 20 und 80 °C, zugesetzt und mit diesem gemischt wird, daß im Anschluß hieran die Mischung auf eine Temperatur erwärmt wird, die etwas oberhalb der Trübungstemperatur liegt und daß nach erfolgter Phasentrennung die azadirachtinreiche Tensidphase abgetrennt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Samenkerne auf Größen zwischen 100 µm und 2 mm zerkleinert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zerkleinerung mittels eines Fleischwolfes mit einer Scheibe erfolgt, deren Lochdurchmesser etwa 3 bis 8 mm beträgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das erhaltene Mahlgut mit etwa der 1 bis 20-fachen Menge an Wasser angesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß dem Wasser bei ca. 20 °C das Mahlgut zugegeben wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Wasserextraktion über einen Zeitraum von ca. 5 Stunden erfolgt, wobei gleichzeitig die Temperatur der Wasserlösung auf bis zu 70 °C erhöht wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Wasserlösung in Abständen von ca. 30 Minuten umgerührt und danach für die Sedimentation ca. 1 bis 3 Stunden stehengelassen wird.

- 12 -

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktion mit frischem Wasser und dem Bodensatz so lange wiederholt wird, bis etwa 90 % des Azadirachtins in die wäßrige Phase gelangt ist.

5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als organisches Lösungsmittel Ketone (wie Butanon, Pentanon, Hexanon), Alkohole (wie 1-Butanol, Pentanol), Ester (wie Essigsäureethylester, Essigsäure-n-butylester) oder halogenierte Kohlenwasserstoffe  
10 (wie Dichlormethan, Trichlormethan) verwendet werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Lösungsmittel zu Wasser etwa 1 : 10 beträgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch  
15 gekennzeichnet, daß das organische Lösungsmittel unter Rühren zugesetzt wird und dann mehrere Stunden stehengelassen wird, bis sich die nichtmischbaren Phasen getrennt haben.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Phase abgetrennt und auf  
20 ca. 1/5 bis 1/10 ihres Volumens eingeengt wird, und daß das so erhaltene Konzentrat in das 1 bis 20-fache Volumen an flüssigen Kohlenwasserstoffen, wie Hexan, Petrolether eingerührt wird und daß der erhaltene Niederschlag von der unpolaren Lösung beispielsweise durch Abgießen getrennt und  
25 der azadirachtinreiche Niederschlag getrocknet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das getrocknete Azadirachtin in pulverform oder aber nach Formulierung mit Tensiden als Insektizid eingesetzt wird.

- 13 -

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Tensid ein p-tertiär-Octylphenol-7,5-glykoether, p-tertiär-Octylphenol-8-10-glykoether, Ölsäure-amidheptaglykoether, Dodecylalkoholheptaglykoether, p-Iso-nonylphenoldekaglykoether verwendet wird.
- 15
15. Verfahren nach einem der Anspruch 1 bis 8 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Wassertensidmischung auf eine Temperatur von etwa 5 °C oberhalb der Trübungstemperatur einer reinen Wasser-Tensid-Mischung erwärmt wird und daß
- 10
- die sich nach einer gewissen Zeit bildende tensid- und azadirachtinreiche Phase abgetrennt wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die azadirachtinreiche Mischung durch Zusatz von Tensiden oder Wasser formuliert wird.
- 15
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der azadirachtinreichen Tensidmischung Wasser im Verhältnis 1 : 500 bis 1 : 5000 zugesetzt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Tensidmischung aus p-tertiär-Octylphenol-7,5-glykoether und p-tertiär-Octylphenol-8-10-glykoether verwendet wird, die es gestattet die Trübungstemperatur in einem weiteren Bereich einzustellen.
- 20
19. Insektizid, dadurch gekennzeichnet, daß das Insektizid nach einem Verfahren gemäß Anspruch 1 hergestellt ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No PCT/DE92/00220

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> : A01N 65/00, 25/02, 25/30		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>5</sup>	A01N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Vol. 103, No.25, 23 December 1985, (Columbus, Ohio, US) K.J. Feuerhake: "Effectiveness and selectivity of technical solvents for the extraction of neem seed components with insecticidal activity", abstract 208833b, & Schriftenr. GTZ, 161 (Nat. Pestic. Neem Tree Other Top. Plants), 103-13, 1984	1-19
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Vol. 105, No.3, 21 July 1986, (Columbus, Ohio, US), J. Meisner et al: "The effect of various extracts of neem seed Kernel on <i>Liriomyza trifolii</i> (Burgess) (Diptera: Agromyzidae)", abstract 20497g, & Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 93(2) 146-52, 1986	1-19
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Vol. 103, No. 23, 9 December 1985, (Columbus, Ohio, US), K.R.S. Ascher et al: "Neem seed Kernel extracts as an inhibitor of growth and fecundity in <i>Spodoptera littoralis</i> ", abstract 191415s, & Schriftenr GTZ, 161 (Nat. Pestic. Neem Tree Other Top. Plants), 331-44, 1984	1-19
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
9 June 1992 (09.06.92)		22 June 1992 (22.06.92)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer



## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	EP, A1, 0405291 (W.R. GRACE & CO.-CONN.NN.) 2 January 1991, see the whole document	1-19
X	US, A, 4943434 (ZEV LIDERT) 24 July 1990, see claims, column 3, lines 41-52	1-19
A	EP, A1, 0405701 (W.R. GRACE & CO.-CONN.NN.) 2 January 1991, see claims; page 2, lines 17-29; page 3, lines 12-13	1-19
A	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Vol. 114, No.19, 13 May 1991, (Columbus, Ohio, US), Paul B. Tanzubil et al: "Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, Spodoptera exempta", abstract 180294c, & Crop Prot., 9(5), 383-6, 1990	1-19
P, A	EP, A1, 0436257 (W.R. GRACE & CO.-CONN. ET AL.) 10 July 1991, see claims, page 2, lines 17-27	1-19
A	US, A, 4556562 (R.O. LARSON) 3 December 1985, see the whole document	1-19
A	DE, A1, 3702175 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN EV) 4 August 1988, see page 8, lines 20-68	1-19

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/DE 92/00220

SA 57577

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 30/04/92  
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A1- 0405291	02/01/91	AU-B-	619720	30/01/92
		AU-D-	5775990	03/01/91
		CA-A-	2016964	26/12/90
		JP-A-	3038506	19/02/91
		US-A-	5001146	19/03/91
-----				
US-A- 4943434	24/07/90	AU-D-	2344588	06/04/89
		EP-A-	0311284	12/04/89
		JP-A-	1163193	27/06/89
-----				
EP-A1- 0405701	02/01/91	AU-B-	615411	26/09/91
		AU-D-	5776090	03/01/91
		CA-A-	2016965	26/12/90
		JP-A-	3038505	19/02/91
		US-A-	4946681	07/08/90
-----				
EP-A1- 0436257	10/07/91	AU-D-	6262790	04/07/91
-----				
US-A- 4556562	03/12/85	NONE		
-----				
DE-A1- 3702175	04/08/88	EP-A-	0276687	03/08/88
		JP-A-	63188681	04/08/88
		US-A-	4902713	20/02/90

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 92/00220

<b>I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.5 A 01 N 65/00, 25/02, 25/30		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.5	A 01 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Band 103, Nr. 25, 23 Dezember 1985, (Columbus, Ohio, US) K.J. Feuerhake: "Effectiveness and selectivity of technical solvents for the extraction of neem seed components with insecticidal activity", Zusammenfassung 208833b, & Schriftenr. GTZ, 161(Nat. Pestic. Neem Tree Other Top. Plants), 103-13, 1984	1-19
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Band 105, Nr. 3, 21 Juli 1986, (Columbus, Ohio, US), J. Meisner et al: "The effect of various extracts of neem seed kernel on Liriomyza trifolii (Burgess) (Diptera: Agromyzidae)", Zusammenfassung 20497g, & Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 93(2) 146-52, 1986	1-19
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
9. Juni 1992	22. 06. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	Maria Pels <i>Maria Pels</i>	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Band 103, Nr. 23, 9 Dezember 1985, (Columbus, Ohio, US), K. R. S. Ascher et al: "Neem seed kernel extracts as an inhibitor of growth and fecundity in Spodoptera littoralis", Zusammenfassung 191415s, & Schriftenr GTZ, 161(Nat. Pestic. Neem Tree Other Top. Plants), 331-44, 1984 --	1-19
X	EP, A1, 0405291 (W.R. GRACE & CO.-CONN.NN.) 2 Januar 1991, siehe Dokument insgesamt --	1-19
X	US, A, 4943434 (ZEV LIDERT) 24 Juli 1990, Siehe die Ansprüche, Spalte 3, Zeilen 41-52 --	1-19
A	EP, A1, 0405701 (W.R. GRACE & CO.-CONN.NN.) 2 Januar 1991, Siehe die Ansprüche; Seite 2, Zeilen 17-29; Seite 3, Zeilen 12-19 --	1-19
A	STN International, File CA, Chemical Abstracts, Band 114, Nr. 19, 13 Mai 1991, (Columbus, Ohio, US), Paul B. Tanzubil et al: "Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, Spodoptera exempta", Zusammenfassung 180294c, & Crop Prot., 9(5), 383-6, 1990 --	1-19
P,A	EP, A1, 0436257 (W.R. GRACE & CO.-CONN. ET AL.) 10 Juli 1991, Siehe die Ansprüche; Seite 2, Zeilen 17-27 --	1-19
A	US, A, 4556562 (R. O. LARSON) 3 Dezember 1985, siehe Dokument insgesamt --	1-19

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	DE, A1, 3702175 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN EV) 4 August 1988, Siehe Seite 8, Zeilen 20-68  -----  -----	1-19

# **ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/DE 92/00220**

SA 57577

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 30/04/92  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A1- 0405291	02/01/91	AU-B- 619720	30/01/92
		AU-D- 5775990	03/01/91
		CA-A- 2016964	26/12/90
		JP-A- 3038506	19/02/91
		US-A- 5001146	19/03/91
US-A- 4943434	24/07/90	AU-D- 2344588	06/04/89
		EP-A- 0311284	12/04/89
		JP-A- 1163193	27/06/89
EP-A1- 0405701	02/01/91	AU-B- 615411	26/09/91
		AU-D- 5776090	03/01/91
		CA-A- 2016965	26/12/90
		JP-A- 3038505	19/02/91
		US-A- 4946681	07/08/90
EP-A1- 0436257	10/07/91	AU-D- 6262790	04/07/91
US-A- 4556562	03/12/85	KEINE	
DE-A1- 3702175	04/08/88	EP-A- 0276687	03/08/88
		JP-A- 63188681	04/08/88
		US-A- 4902713	20/02/90

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82